


# METHOD FOR SEPARATING POLYHYDROXYALKANOIC ACID FROM BIOLOGICAL CELL

Patent Number: JP2001340095  
 Publication date: 2001-12-11  
 Inventor(s): IMAMURA TAKESHI; KENMOKU TAKASHI; SUZUKI TOMOHIRO; HONMA TSUTOMU; NOMOTO TAKESHI; SUGAWA ETSUKO; YANO TETSUYA  
 Applicant(s): CANON INC  
 Requested Patent:  JP2001340095  
 Application Number: JP20010067254 20010309  
 Priority Number (s):  
 IPC Classification: C12P7/62; B01J19/12  
 EC Classification:  
 Equivalents:

## Abstract

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method by which the use of an organic solvent can be suppressed to the minimal amount on a large scale and a polyhydroxyalkanoic acid(PHA) that is a polyester produced by a microorganism can efficiently be separated.  
**SOLUTION:** This method for separating the PHA from a biological cell is to recover the PHA from the biological cell containing the PHA and is characterized by comprising a step of irradiating the biological cell with microwaves.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-340095  
(P2001-340095A)

(43) 公開日 平成13年12月11日 (2001. 12. 11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 P 7/62		C 1 2 P 7/62	
B 0 1 J 19/12		B 0 1 J 19/12	A
// (C 1 2 P 7/62		(C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:01)		C 1 2 R 1:01)	
(C 1 2 P 7/62		(C 1 2 P 7/62	
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2001-67254(P2001-67254)	(71) 出願人	000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
(22) 出願日	平成13年3月9日(2001.3.9)	(72) 発明者	今村 剛士 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ ノン株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2000-88715(P2000-88715)	(72) 発明者	見目 敬 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ ノン株式会社内
(32) 優先日	平成12年3月28日(2000.3.28)	(74) 代理人	100088328 弁理士 金田 暢之 (外2名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 生体細胞からのポリヒドロキシアルカン酸の分離方法

(57) 【要約】

【課題】 微生物生産ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(P H A)を、ラージスケールにおいて有機溶剤の使用を最小限の量にとどめることができ、かつ効率的に分離可能な方法を提供する。

【解決手段】 ポリヒドロキシアルカン酸を含有する生体細胞から、ポリヒドロキシアルカン酸を回収する方法であって、該生体細胞にマイクロ波を照射する工程を含むことを特徴とする生体細胞からのポリヒドロキシアルカン酸の分離方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ポリヒドロキシアルカン酸を含有する生体細胞から、ポリヒドロキシアルカン酸を回収する方法であって、該生体細胞にマイクロ波を照射する工程を含むことを特徴とする生体細胞からのポリヒドロキシアルカン酸の分離方法。

【請求項 2】 マイクロ波を照射した該生体細胞をポリヒドロキシアルカン酸が溶解しうる溶媒で処理することによりポリヒドロキシアルカン酸を回収し、次いでポリヒドロキシアルカン酸が溶解しない溶媒により該回収されたポリヒドロキシアルカン酸を洗浄する工程を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 該ポリヒドロキシアルカン酸が溶解しうる溶媒がクロロホルム、アセトン、ジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルのいずれか一つである請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 該ポリヒドロキシアルカン酸が溶解しうる溶媒の使用量がマイクロ波を照射した該生体細胞 1 g (乾燥重量) 当たり 1 mL から 10 mL である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】 該ポリヒドロキシアルカン酸が溶解しない溶媒がメタノール、エタノールのいずれか一つである請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】 マイクロ波を照射した該生体細胞を、ポリヒドロキシアルカン酸以外の生体細胞成分を可溶化剤を用いて溶解処理を行なう工程を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 該可溶化剤がタンパク質分解酵素及び/或いは界面活性剤である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 該生体細胞の pH を 10 以上に調整する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】 該生体細胞の pH を 2 以下に調整する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】 該生体細胞に硫酸を加えることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、微生物により生産・蓄積されたポリヒドロキシアルカン酸の、生体細胞からの分離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ポリ 3-ヒドロキシ酪酸(PHB)に代表される微生物産生ポリエステル(ポリヒドロキシアルカン酸；以下 PHA と記載)は、石油由来の合成高分子とは異なり、生物により分解されうるという特性を有している。人類は長年にわたって合成高分子をプラスチック等として使用してきたが、それらのプラスチックが廃棄物となった場合、その分解されにくいという性質が災いし、廃棄物処理場に蓄積される。また、焼却処理を行なうことにより、ダイオキシンや環境ホルモン等の有害物

質の原因となり、環境汚染を引き起こすことが問題となっている。一方、微生物産生 PHA は生分解されることにより自然の物質循環に取り込まれるので、環境保全を可能とするプラスチックとして利用することができる。また、医療用軟質部材としても今後有用視される可能性を有している(特開平 5-159 号公報)。

【0003】 これまで、多くの細菌が PHB 或いはその他のヒドロキシアルカン酸とのコポリマーを菌体内に生成・蓄積することが報告されてきた(「生分解性プラスチックハンドブック」(生分解性プラスチック研究会編；(株)エヌ・ティー・エス)、p178-197)。特に、アルカリゲネス・ユウトロファス H16 (*Alcaligenes eutrophus* H16, ATCC No.17699) 及びその変異株はこれらポリマーの生産に関し詳細に研究されてきており、基質となる炭素源を変化させることによって、3-ヒドロキシ酪酸(3HB)と 3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)の共重合体または両者の各単位を共に含有成分とする共重合体を様々な割合で生成することが開示されている(特公平 6-15604 号公報、特公平 7-14352 号公報、特公平 8-19227 号公報等)。

【0004】 特許公報第 2642937 号には、シュードモナス・オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347 株に、炭素源として非環状脂肪酸炭化水素を与えることにより、炭素数が 6 から 12 までの 3-ヒドロキシアルカン酸(3HA)をモノマーユニットとするポリエステルを生産することが開示されている。

【0005】 特開平 5-74492 号公報には、メチロバクテリウム(*Methylobacterium*)属、パラコッカス(*Paracoccus*)属、アルカリゲネス属、シュードモナス属のバクテリアを、炭素数 3 から 7 の第一アルコールに接触させることにより 3HB と 3HV の共重合ポリエステルを生産せしめる方法が開示されている。

【0006】 特開平 5-93049 号公報、及び特開平 7-265065 号公報には、アエロモナス・キャビエ(*Aeromonas Caviae*)がオレイン酸やオリーブオイルを炭素源として培養することにより 3HB と 3-ヒドロキシヘキサノ酸(3HHx)の 2 成分共重合ポリエステルを生産することが開示されている。

【0007】 特開平 9-191893 号公報には、コマモナス・アシドボランス(*Comamonas acidovorans*) IFO 13852 株が、炭素源としてグルコン酸及び 1,4-ブタンジオールを用いた培養により、3HB と 4-ヒドロキシ酪酸(4HB)をモノマーユニットに持つポリエステルを生産することが開示されている。

【0008】 この様な、微生物により生産・蓄積された PHA は、通常 PHA が溶解する有機溶剤、具体的にはクロロホルムやジクロロメタン等の塩素系有機溶剤で菌体から抽出する方法が一般的である。しかし、大規模生産を考えた場合、微生物菌体より PHA を分離するためには、上記の方法では大量に塩素系有機溶剤を使用する

こととなり、現実的ではない。

【0009】このような観点から、微生物菌体等の生体細胞からPHAを分離する際に、有機溶剤を使用しない方法が様々に研究されてきている。

【0010】特開昭57-174094号公報には、PHA蓄積菌体を加温加圧し、圧力を開放することにより菌体を破砕して微生物菌体からPHAを分離する方法が開示されている。

【0011】米国特許4562245号公報及び特開昭59-205992号公報には、PHB含有菌体をタン

パク質分解酵素組成物で細胞を消化し、PHBを分離する方法が開示されている。

【0012】米国特許4910145号公報及び特開昭60-145097号公報には、タンパク質分解酵素や界面活性剤等の細胞成分可溶化剤をもちいてPHBを菌体から分離する方法が開示されている。

【0013】特開昭63-226291号公報には、菌体をスフェロボラストへ変換し、音波振動処理によってこれらを破砕し、そして遠心分離したのちに形成される最上層のPHAを分離する方法が記載されている。

【0014】特開平5-336982号公報には、PHA蓄積微生物の細胞質をプロテアーゼで溶解させ、界面活性剤を用いて当該重合体及び/又は共重合体を精製する方法が開示されている。

【0015】特開平7-31487号公報、特開平7-31488号公報、特開平7-31489号公報には、PHB含有菌体をアルカリで処理し、PHBを分離する方法、高温高圧処理し、PHBを分離する方法、両者を組み合わせてPHBを分離する方法が開示されている。

【0016】特表平8-508881号公報には、PHA蓄積菌体をタンパク質分解酵素処理した後、適当なキレート剤で処理し、更に過酸化水素処理を行なうことでPHAを菌体から分離する方法が開示されている。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】このように、微生物生産ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を、溶媒を使用せずに分離する方法は様々開示されてきているが、回収率が上がらない、純度が高くない、分子量が低下するなど、様々な問題点が少なからず存在し、実用上必ずしも十分であるとは言えない。一方PHAの利用は今後ますます拡がっていくことが予想され、PHAをラージスケールで効率的に、かつ高純度・高品質で分離する必要性はますます高まっている。従来分離プロセスではかかる理想的分離には多量の有機溶剤とリわけ塩素系有機溶剤が大量に必要とされていたが、これを最小限の使用量で分離効率・品質を保つことを可能にすること、あるいは全く使用しない場合でも従来よりも分離効率・品質にかなりの改善が認められるような方法の開発が強く望まれていた。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、このような課題を解決すべく鋭意研究の結果以下のような、微生物菌体等の生体細胞からのポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の分離方法を発明するに至った。即ち本発明は、ポリヒドロキシアルカン酸を含有する生体細胞から、ポリヒドロキシアルカン酸を回収する方法であって、該生体細胞にマイクロ波を照射する工程を含むことを特徴とする生体細胞からのポリヒドロキシアルカン酸の分離方法に関するものである。

10 【0019】

【発明の実施の形態】マイクロ波を照射した後の処理方法の一つは、マイクロ波を照射した該微生物菌体等の生体細胞をポリヒドロキシアルカン酸が溶解しうる溶媒により回収し、次いでPHAが溶解しない溶媒によりポリヒドロキシアルカン酸を洗浄する方法がある。この場合、PHAが溶解しうる溶媒として、従来から抽出に用いられているクロロホルムを用いた場合はいかなるヒドロキシアルカン酸ユニットを含んでいるPHAでも非常に良好な結果が得られる。溶媒の使用量はPHAの溶解に必要なだけでよく、例えばマイクロ波を照射した該微生物菌体1g(乾燥重量)当たり0.1mLから15mL、好ましくは1mLから10mLあればよい。すなわち従来の抽出のみのプロセスのように問題となる大量使用の必要がない。

【0020】炭素数が6以上のヒドロキシアルカン酸ユニットが組成の大部分をなすPHAであればより害の少ないアセトンでも良好に溶解する。更にユニットの構造によってはジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルも用いることができる。

30 【0021】また、PHAが溶解しない溶媒としては、メタノール、エタノールを用いることができる。

【0022】マイクロ波を照射した後の処理方法の一つは、マイクロ波を照射した該水性懸濁液を、PHA以外の微生物菌体等の生体細胞成分の可溶化剤処理を行なう工程を含む方法がある。この場合、可溶化剤としては、菌体成分加水分解酵素或いは界面活性剤、或いはその両方が使用される。用いる菌体成分加水分解酵素としてはプロテアーゼ、リパーゼ、リゾチーム、パバイン等、通常菌体成分加水分解酵素として用いられているものならいかなるものでも使用可能である。用いる界面活性剤としては、硫酸ドデシルナトリウム塩(SDS)やトリトンX等、通常菌体成分を変成・可溶化せしめるようなものならいかなる物でも用いることができる。

【0023】更に、マイクロ波照射と併せて、菌体の水性懸濁液のpHを10以上に調整する方法もといる。具体的には水酸化ナトリウムや水酸化カリウムを0.01mol/Lから0.5mol/L(0.01規定から0.5規定)程度の濃度で加え、よく攪拌した後にマイクロ波照射を行なうと良いが、水酸化ナトリウムや水酸化カリウムの濃度は用いる微生物によって異なり、PHAの分子量低下や変成を

50

防ぐために最小限にとどめることが望ましい。

【0024】逆に、菌体の水性懸濁液のpHを2以下に調整する方法もとりうる。具体的には硫酸を10%から50%(v/v)程度の濃度で加え、よく攪拌した後にマイクロ波照射を行なうと良いが、硫酸の濃度は用いる微生物によって異なり、PHAの分子量低下や変成を防ぐために最小限にとどめることが望ましい。

【0025】これらのようにpHを調整した後マイクロ波を照射した場合には、中和操作が必要となるが、処理後の溶液を直接中和した場合は不溶成分が多量に発生するので、反応後一旦遠心分離等で分離した後、再懸濁液を中和することが望ましい。

【0026】更に、マイクロ波照射と併せて、菌体の水性懸濁液に予め界面活性剤処理を行なう方法もとりうる。用いる界面活性剤としては、硫酸ドデシルナトリウム塩(SDS)やトリトンX等、通常菌体成分を変成・可溶化させようようなものならいかなる物でも用いることができる。

【0027】マイクロ波処理方法では、菌体質量の5から50倍量、好ましくは10から30倍量の水性媒体を用いて、100mL当り出力0.5から2kW、好ましくは0.8から1.7kWの高周波(周波数900から2500MHz程度)を照射する方法が用いられる。実験室レベルでは市販の電子レンジで十分であるが、大規模な抽出操作の場合には特開平8-20009号公報に開示されているような大型の装置が必要となる。

【0028】本発明の方法を用いることができる生体細胞は、体内にPHAを蓄積する等の生体細胞であればいかなる等の生体細胞でもよく、主には微生物菌体、更にはPHA生産遺伝子を組み換えた植物細胞にも応用することができる。

【0029】以下実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

【0030】各実施例で用いたM9培地は下記の組成を有するものである。

M9培地組成(1リットル中):

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.2g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0g  
NaCl 0.5g  
NH<sub>4</sub>Cl 1.0g  
水 残部

(pH7.0)

本実施例で用いた微生物はラルストニア ユウトロファ TB64株(Ralstonia eutropha TB64、特開2000-166587号公報に開示; 経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託(寄託番号:FERMBP-6933))、及びシュードモナス オレオボランス(Pseudomonas oleovorans)ATCC 29347(American Type Culture Collection より分譲)である。

【0031】

【実施例】[実施例1]ビルビン酸ナトリウム0.1%を含有するM9寒天培地上のTB64株のコロニーを、500mL容振とうフラスコ中の、ビルビン酸ナトリウム0.5%を含有するM9培地200mLに接種し、30°Cで振とう培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、窒素源であるNH<sub>4</sub>Clを含まない、ビルビン酸ナトリウム0.5%を含有するM9培地200mLに再懸濁し、同様に振とうして菌体にPHBを蓄積させた。24時間後、PHB蓄積菌体を遠心分離によって収穫し、蒸留水40mLに再懸濁して4等分した。これらを1から4まで番号をつけ、以下の処理を行なった。

【0032】1:対照:メタノールで洗浄し、凍結乾燥して秤量した後クロロホルムで60°C、24時間抽出操作を行なった。

【0033】2:5mol/L(5規定)の水酸化ナトリウムを、最終濃度0.1mol/L(0.1規定)になるように加え、室温で10分間攪拌した。

【0034】3:1の操作を行なった後、家庭用電子レンジ(0.8kW、2450MHz)で5分間処理した。

【0035】4:家庭用電子レンジ(0.8kW、2450MHz)で8分間処理した。

【0036】番号2から4は、処理後蒸留水30mLを加え良く攪拌した後遠心分離(8000rpm、10分間)し、更に再度後蒸留水40mLを加え良く攪拌した後遠心分離し(2に関しては希塩酸によりpH7程度まで中和し)、沈殿物を凍結乾燥し、秤量した。

【0037】以下に示す「回収率」及び「純度」を評価する為、次の操作を行なった。

【0038】凍結乾燥した1から4までの試料にクロロホルム30mLを加え、60°Cで24時間攪拌抽出操作を行なった。PHBが抽出されたクロロホルム溶液を0.45μmのPTFEフィルターでろ過し、ロータリーエバポレーターで濃縮して10倍量のメタノールに注加しPHBを沈殿、回収した。これらを減圧乾燥して秤量した。

【0039】対照である1における、クロロホルム抽出によって得られたPHBに対する、対から、のクロロホルム抽出によって得られたPHBの質量比を回収率、各試料の、クロロホルム抽出前の試料に対するクロロホルム抽出によって得られたPHBの質量比を純度とし、表1に示す。

【0040】

【表1】

表1

	クロロホルム抽出 前重量(mg/L)	クロロホルム抽出 後重量(mg/L)	回収率 (%)	純度 (%)
1	2600	1420	-	-
2	1800	920	64.8	51.1
3	600	520	36.6	86.7
4	1400	1220	85.9	87.1

回収率、純度とも、マイクロ波(電子レンジ)処理のみを行なった試料(4)が最も良好であった。

【0041】得られたPHBは、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8020、カラム: ポリマラーボラトリーPLgelMIXED-C(5  $\mu$  m)、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算)により分子量を測定した。結果を表2に示す。なお、「試料2」はピークが2つに分離したため両方を示す。

【0042】

【表2】

表2

	Mn	Mw	Mw/Mn
1	360000	1000000	2.8
2	310000	860000	2.7
	1900	2000	1.1
3	21000	42000	2.0
4	390000	980000	2.5

対照に対する分子量の低下は、マイクロ波(電子レンジ)処理のみを行なった試料(4)では全く見られなかった。

【0043】[実施例2] 実施例1と同様に得られたTB64株のPHB蓄積菌体(各培養液 50mL分)を 10mLの蒸留水に再懸濁した試料を2サンプル用意し、試料5及び6として、以下の処理を行なった。

【0044】5: 家庭用電子レンジ(0.8kW、2450MHz)で5分間処理した。

【0045】6: 5の処理を行なった後、最終濃度 0.2%となるようにSDS水溶液を加え、1分間激しく攪拌した。

【0046】各サンプルは、実施例1と同様に、処理後蒸留水 30mLを加え良く攪拌した後遠心分離(8000rpm、10分間)し、更に再度後蒸留水 40mLを加え良く攪拌した後遠心分離し、沈殿物を凍結乾燥し、秤量した。

【0047】これらの試料を実施例1と同様にクロロホルム抽出し、回収率及び純度を求めた。結果を表3に示す。なお、回収率の対照は実施例1における試料1のデータを用いた。

【0048】

【表3】

表3

	クロロホルム抽出 前重量(mg/L)	クロロホルム抽出 後重量(mg/L)	回収率 (%)	純度 (%)
5	1640	1260	88.7	76.8
6	1340	1300	91.5	97.0

実施例1に比べ温和な条件でマイクロ波処理し、更に界面活性剤であるSDS処理を行なうことにより、高い回収率及び純度でPHBを回収することが可能であった。

【0049】得られたPHBは実施例1と同様にGPCで分子量を測定した。結果を表4に示す。

【0050】

【表4】

表4

	Mn	Mw	Mw/Mn
5	380000	960000	2.5
6	370000	980000	2.6

分子量の低下は全く見られなかった。

【0051】[実施例3] n-ノナン酸 0.1%を含有するM9寒天培地上のシュードモナス・オレオバランスのコロニーを、500mL容振とうフラスコ中の、n-ノナン酸 0.2%を含有するM9培地 200mLに接種し、30°Cで振とう培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、窒素源であるNH<sub>4</sub>Clを含まず、n-ノナン酸 0.1%及び5-フェニル吉草酸 0.1%を含有するM9培地 200mLに再懸濁し、同様に振とうして菌体に3-ヒドロキシノナン酸、3-ヒドロキシヘブタン酸、3-ヒドロキシ吉草酸、及び3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸をユニットとして含むPHAを蓄積させた。24時間後、PHA蓄積菌体を遠心分離によって収穫し、以下の処理を行なった。

【0052】7: 対照: メタノールで洗浄し、凍結乾燥して秤量した後クロロホルムで 60°C、24時間抽出操作を行なった。

【0053】8: 30%硫酸水溶液 50mLに懸濁し、室温で 24時間攪拌した。

【0054】9: 30%硫酸水溶液 50mLに懸濁した後、家庭用電子レンジ(0.8kW、2450MHz)で1分間処理を3回繰り返した。

【0055】これらの試料を実施例1と同様にクロロホルム抽出し、回収率及び純度を求めた。結果を表5に示す。

【0056】

【表5】

表5

	クロロホルム抽出 前重量(mg/L)	クロロホルム抽出 後重量(mg/L)	回収率 (%)	純度 (%)
7	1800	890	-	-
8	1440	790	88.8	54.9
9	930	780	87.6	83.9

得られたPHAは実施例1と同様にGPCで分子量を測定した。結果を表6に示す。

【0057】

【表6】

表6

	Mn	Mw	Mw/Mn
7	34000	89000	2.6
8	32000	90000	2.8
9	30000	92000	3.1

硫酸を加え、マイクロ波処理することにより、幾つかのユニットを含んだPHA成分が、高純度、高回収率で分子量低下もそれ程なしに回収することが可能であった。

【0058】

【発明の効果】本発明の方法により、微生物等の生体細胞内に蓄積されたポリヒドロキシアルカン酸を、簡便な\*

\*方法で、且つ本来の分子量をほぼ保ったままで、高い回収率で回収することが可能となった。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup> C 1 2 R 1:38)	識別記号	F I C 1 2 R 1:38)	テーマコード (参考)
(72)発明者 鈴木 智博 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内		(72)発明者 野本 毅 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内	
(72)発明者 本間 務 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内		(72)発明者 須川 悦子 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内	
		(72)発明者 矢野 哲哉 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内	